

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Bredt)

**QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER „FREIEN“
DNS-PO₄-GRUPPEN IN MENSCHLICHEN
LEBERZELLKERNEN IN ABHÄNGIGKEIT
VOM LEBENSALTER**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Dieter Heimer
aus Groß-Umstadt

Mainz 1972

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Bredt)

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER "FREIEN"
DNS-PO₄-GRUPPEN IN MENSCHLICHEN LEBERZELLKERNEN
IN ABHÄNGIGKEIT VOM LEBENSALTER

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

DIETER HEIMER

aus Groß-Umstadt

Mainz 1972

Dekan: Prof. Dr. Dr. W. Ketterl

Referent: Prof. Dr. H. Bredt



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	4
Ergebnisse	9
Diskussion	33
Zusammenfassung	37
Literatur	38
Lebenslauf	44

EINLEITUNG

GURDON und UEHLINGER (1966) konnten experimentell nachweisen, daß in den Kernen somatischer Zellen der für den Gesamtorganismus notwendige Informationsgehalt in Form chromosomal geordneter DNS vorhanden ist. In der hochdifferenzierten Somazelle wird aber nur der Anteil der Gesamtinformation abgerufen, der für die jeweilige spezifische Stoffwechselleistung benötigt wird. Die anderen Bereiche des Genoms sind permanent reprimiert (JACOB und MONOD, 1961).

Die Repression der Übertragung der genetischen Information über die RNS-Synthese in die Proteinsynthese scheint nach neueren Untersuchungen mit strukturellen Veränderungen im DNS-Komplex einherzugehen (HERMANN und Mitarbeiter, 1969), deren elektronenoptisches Substrat sich in einer stärkeren Faltung und einer durch Proteineinlagerung bedingten Verdickung der chromosomalen DNS-Filamente darstellt (RIS, 1967). Einen mikrocyclophotometrisch erfaßbaren Indikator für die mit dieser Proteineinlagerung einhergehende Änderung der helicalen Ordnung des Chromatins stellt die von RIGLER (1966) inaugurierte Akridinorange(AO)-Reaktion dar, die auf der Intercalation von AO-Molekülen in die DNS-Helix beruhen, wobei sterisch freie DNS-PO_4^- -Gruppen als elektrostatische Haftpunkte dienen.

Die Menge der in einem Zellkern eingelagerten AO-Moleküle kann anhand ihrer Fluoreszenzemission quantitativ bestimmt werden. Da die Anlagerung von AO-Molekülen im Chromatin über DNS-PO_4^- -Gruppen erfolgt, die wahrscheinlich auch basischen Proteinen mit Repressorfunktion als Haftpunkte dienen, könnten Änderungen in der AO-Bindungskapazität des Zellkerns Aufschluß über den Re- bzw. De-Repressionszustand des Chromatins geben.

In einer Reihe vorangegangener Arbeiten konnte nachgewiesen werden, daß die Akridinorange-Bindungskapazität der Leberzellkerne 8 Monate alter Meerschweinchen um 30 % höher liegt als der 48 Monate alter Tiere (DENKHAUS u. HEIMER, 1970).

Die Abnahme der AO-Bindungskapazität in Abhängigkeit vom steigenden Organalter kann verschiedene Ursachen haben:

- 1) Zunahme des Zell- bzw. Zellkerndurchmessers, und davon abhängig, Verlängerung des Diffusionsweges für die AO-Moleküle.
- 2) Abnahme der Membranpermeabilität.
- 3) Zunahme des relativen oder absoluten Trockengewichtes des Zellkerns mit Herabsetzung der Diffusionsgeschwindigkeit der AO-Moleküle.
- 4) Bildung von Vernetzungen innerhalb der Proteine des Zellkerns, die ebenfalls die Diffusionsgeschwindigkeit der AO-Moleküle beeinträchtigen würde.
- 5) Abnahme der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen, die für die AO-Bindung notwendig sind.

Cytofluorometrische Messungen von Zellkernen, die ohne Acetylierung bei pH 6,5 mit AO gefärbt wurden, wobei alle Anionen im Zellkern erfaßt werden, zeigen, daß die Möglichkeiten 2 - 4 nur von geringem Einfluß sein können, da keine sicheren Unterschiede zwischen "jungen" und "alten" Zellkernen erhalten werden konnten. Weiterhin ändert sich der mittlere Durchmesser der Zellkerne mit steigendem Lebensalter sehr wenig, und wenn, mit der Tendenz zu kleineren Durchmessern (TAUCHI u. SATO, 1962; DENKHAUS, 1970). Infolgedessen kann eine Verlängerung der Diffusionswege ausgeschlossen werden.

Aus diesen Gründen erscheint es gerechtfertigt, die mit steigendem Individualalter erfolgende Abnahme der AO-Bindungskapazität bei pH 4,1 nach Acetylierung, die die "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen erfaßt, altersabhängigen Veränderungen im Nucleoproteinkomplex zuzuschreiben.

Nimmt man dieses Modell als Grundlage für die Interpretation unserer vorhergehenden Untersuchungen, so kann man eine Abnahme der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen mit steigendem Individualalter annehmen, wobei der Gesamtgehalt der DNS keine altersabhängigen Veränderungen zeigt (ENESCO, 1967; DENKHAUS, 1970).

Ausgehend von diesen Untersuchungen sollen in der vorliegenden Arbeit zwei weiterführende Fragen untersucht werden:

- 1) Lassen sich die an Labortieren erzielten Ergebnisse auch an menschlichem Untersuchungsmaterial nachweisen?
- 2) Kann man eine Verlaufskurve der Anzahl "freier" DNS-PO_4^- -Gruppen in Abhängigkeit vom Lebensalter aufzeigen?

MATERIAL UND METHODE

I. Material

Untersucht wurden Kerne menschlicher Leberzellen von Individuen zwischen dem 12. und dem 83. Lebensjahr in Ausstrichpräparaten.

Die Präparate wurden durch Punktion Verstorbenen innerhalb der ersten 9 Stunden nach dem Tode, meist jedoch vor der sechsten Stunde gewonnen. Die Punktion erfolgte nach perkutorischer Lagebestimmung der Leber und Hautschnitt im 7./8. ICR rechts in der vorderen Axillarlilie; Entnahme zweier Punktionszylinder von der gleichen Stelle aus dem rechten Leberlappen. Das Material wurde bis zur Weiterverarbeitung in COOMBS-Puffer von 4°C aufbewahrt, maximal bis 25 min. Einzelzellen wurden durch Zerquetschen eines 5 mm langen Stückes des Punktionszylinders zwischen zwei gereinigten Objektträgern gewonnen, Ausstrich mit der Kante eines Objektträgers auf einem zweiten fluoreszenzfreien Objektträger (Fa. Kindler, Freiburg). Auf diese Weise wurden jeweils vier Präparate hergestellt. 20 min. Lufttrocknung, danach Aufbewahrung bis zur gemeinsamen Weiterverarbeitung über Silicagel bei - 25°C Celsius. Gleichzeitig wurden zur histologischen Kontrolle Gefrierschnitte des Punktionsmaterials hergestellt und mit Haematoxilin-Eosin gefärbt.

Eine Weiterverarbeitung der Ausstrichpräparate wurde nur dann vorgenommen, wenn die histologische Untersuchung keine wesentlichen pathologischen Veränderungen ergab.

Die Dauer der Aufbewahrung betrug maximal 12 Tage. Die innerhalb dieser Zeitspanne anfallenden Präparate wurden zu Gruppen zusammengefaßt. Die Präparate einer Gruppe

wurden in einem Arbeitsgang gefärbt und ausgewertet. Es ergaben sich, bedingt durch den unterschiedlichen Materialanfall, 7 Gruppen mit jeweils 4 bis 11 Präparaten.

II. Färbung

Färbung der Kontrollschnitte mit Haematoxin-Eosin (ROMEIS, 1968). Die histochemische Färbung und mikrofluorometrische Auswertung erfolgte in Gruppen von 4 bis 11 Fällen. Es wurde jeweils ein Präparat pro Fall ausgewertet. Färbung mit Akridinorange, pH 4,1, nach Acetylierung. Akridinorange (Fa.E.Merck, Darmstadt, W.-Deutschland, C.I. 46005, S.Nr.902) gereinigt in einer Al_2O_3 -Säule nach ZANKER (1952). Prüfung des Reinheitsgrades nach RIGLER (1966). Aus einer Standardlösung von 1 mg/ml aqua bidest. wurde eine für die gesamte Färbereihe ausreichende Menge Farbstofflösung mit einer Endkonzentration von 10^{-4} M in Zitronensäure- Na_2HPO_4 -Puffer, pH 4,1, unter radiometrischer Kontrolle hergestellt. Färbung: 1. Pyridin, wasserfrei (Fa. E. Merck, Darmstadt, W.-Deutschland, Nr. 7461) 5 min, 2. Pyridin-Essigsäureanhydrid (Fa. E. Merck, Nr. 42) 3:2, 15 min, 3. Äthanol 100 %, 96 %, 60 %, 30 %, jeweils 5 min, 4. Aqua bidest. 3 min, 5. Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 4,1 5 min, 6. Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 4,1 + $\text{AO } 10^{-4}$ M 15 min, 7. Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 4,1 3 x 5 min, 8. Eindecken mit Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 4,1, Deckglasgröße 24 x 50 mm, unter Belastung von 2 x 10 g Umrandung mit Nagellack.

III. Mikrofluorometrische Messungen

Die mikrofluorometrischen Messungen wurden mit einem Mikroskopphotometer mit variabler Meßblende vorgenommen (Fa. E. Leitz, Wetzlar, W.-Deutschland). Aufbau im wesentlichen nach BÖHM und SPRENGER (1968).

1) Durchlicht zur Objekteinstellung

Phasenkontrast (Kondensor nach HEINE, 1931); Ölimmersionsobjektiv PvFl 70x, N.A. 1,15; Niedervoltlampe 5 Volt. Die Ausbleichung wurde durch Vorschaltung eines Interferenzdoppelbandfilters $618 \pm 19 \text{ nm}$ (Fa. Schott u. Gen., Mainz, W.-Deutschland) niedrig gehalten. Ausbleichkurven dazu aus DENKHAUS und HEIMER (1970) siehe Abb. 1.

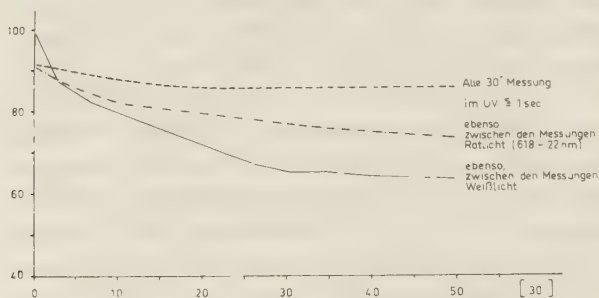


Abb. 1 Ausbleichkurven für AO-gefärbte Leberzellkerne. Ordinate: Fluoreszenzemission in $2 \times 10^{-3} \mu\text{A}$. Abszisse: Anzahl der Messungen bei einem zeitlichen Abstand der Messungen von jeweils 30 sec. Färbung AO 10^{-4} M , pH 4,1, nach Acetylierung. Nach: DENKHAUS und HEIMER (1970).

2) Messung in Auflichtfluoreszenz

Optische Einrichtung: PLOEM-Opak, Objektiv PvFl 70x wie oben. Anregung durch Xenon-Höchstdruckbrenner XBO 150 W (Osram, Berlin, W.-Deutschland), Gleichrichter-Vorschaltgerät Typ VX 150f-2b-L unter Vor-schaltung eines Spannungskonstanthalters Typ EMK VX (Dominit) (beide Geräte: Fa. Siemens, Erlangen, W.-Deutschland); Wärmeschutzfilter; Erregerfilter: UG 1, 1 mm, BG 38 1 mm; Sperfilter: Interferenzband-verlaufsfilter Veril a, Typ B-60 (alle Filter: Schott u. Gen., Mainz). Messung bei 530 und 590 nm. Meßeinrichtung: S-20 Photokathode, Typ 9558 A (Fa. EMI, Gr.-Britannien), spektrale Empfindlichkeit siehe Abb. 2.

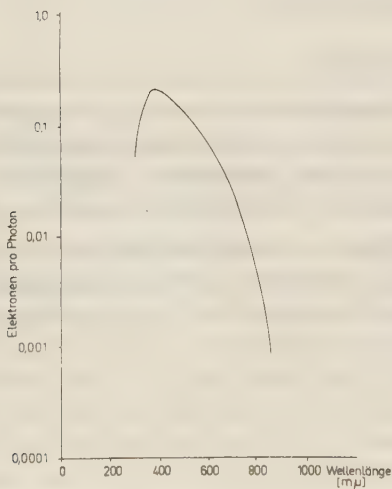


Abb. 2 Spektrale Empfindlichkeit der Photokathode S-20, Typ 9558 A.

Spannungsteiler Typ SKV/K BN 345 A, hochstabilisiertes Netzgerät Typ NSH M BN 600 S/N 481, zusammengefaßt in der Lichtmeßeinrichtung Typ MFLK BN 5007 (Fa. Knott Elektronik, München, W.-Deutschland). Saugspannung 1,3 KV. Meßinstrument: Mikroamperemeter, Meßbereich 0,0018 - 20 μ A/Skalenteil, eingestellt: 0,02 μ A/Skt (Fa. Norma, Wien, Österreich).

Meßvorgang: Das Objekt (Zellkern) wurde bei 618 nm im Phasenkontrast eingestellt. Ausblendung des Durchlichts; Öffnen des Photomultipliierverschlusses, dabei Interferenzbandverlaufsfilter auf 530 nm; Einblenden des UV-Lichtes, Ablesen des maximalen Galvanometerauschlages nach ± 1 sec, Ausblenden des UV-Lichtes; Filter auf 590 nm; Messung erneut im UV-Licht; Leerwert in umgekehrter Reihenfolge direkt neben dem Objekt gemessen. Pro Präparat wurden 20 Zellkerne gemessen.

Bei der Messung war nicht bekannt, zu welcher Altersgruppe das Präparat gehörte.

IV. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden nur die Gruppen A, B, E herangezogen, da sie jeweils eine vergleichbare Anzahl von Einzelfällen (Präparate) enthielten: Gruppe A: 11 Fälle; Gruppe B: 9 Fälle; Gruppe E: 10 Fälle.

Die Berechnungen erfolgten im Institut für Med.Statistik und Dokumentation (Mainz) mit Hilfe eines programmierten Tischrechners (Olivetti Programma 101) und des Computers CDC 3300.

ERGEBNISSE

I. Kernmorphologie

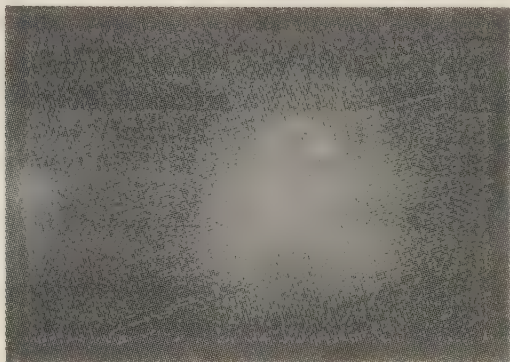


Abb. 3 Isolierte Leberzelle, mit Acridinorange gefärbt, Vergrößerung 900fach.

Bei jungen Individuen finden sich überwiegend runde Zellkerne gleicher Größe (6-9 μ m) mit ein bis zwei deutlich sichtbaren runden Nucleolen. Alte Individuen weisen dagegen starke Unterschiede in Kerngröße und Kernform auf. Die Kerngröße variiert von halber Normalgröße bis zu solchen Kernen, die mehr als doppelt so groß sind wie normal. Außerdem zeigen Kerne aus dem Lebergewebe alter Individuen zahlreiche Formveränderungen, die sich im Ausstrich deutlich von dem monomorphen Bild, das für junge Individuen charakteristisch ist, abheben. So finden sich neben ovalären Formen Kerne mit gelappten, gewellten oder ausgebuchteten Konturen. Auffällig ist weiterhin, daß in diesen Ausstrichpräparaten mit großer Regelmäßigkeit segmentkernige bzw. hypersegmentierte Granulozyten nachweisbar sind.

Ebenso häufig findet man rundkernige Zellelemente, die aufgrund ihrer Größe und der Chromatinstruktur ihrer Kerne am ehesten Lymphozyten entsprechen dürften.

II. Ploidieklassen

Trägt man die Anzahl der Kerne einer Fluoreszenzemissionsklasse zwischen 0 und 220 μA gegen die Fluoreszenzemission auf, so erhält man Kurven, die Auskunft über die Verteilung der Meßwerte innerhalb des Meßbereiches geben. Das soll am Beispiel der Abbildung 4 (oben, 23 J.) erläutert werden.

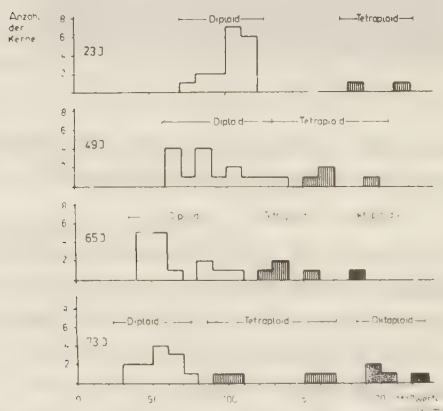


Abb. 4 Die Abbildung zeigt die Histogramme von vier Probanden verschiedenen Lebensalters aus der Färbereihe B. Klassengröße 10 Einheiten ($0,02 \mu\text{A}$), aufgetragen sind die Meßwerte bei 530 nm.

Gemessen wurden 20 Zellkerne. Von diesen zeigte einer eine Emission, die zwischen 70 und 80 μ A lag, bei zweien fanden sich Werte zwischen 80 und 90 μ A. Zwischen 90 und 100 μ A fanden sich ebenfalls zwei Kerne, während das Maximum, nämlich 7 Kerne in den Bereich zwischen 100 und 110 μ A fielen. 6 Kerne lagen zwischen 110 und 120 μ A und jeweils einer im Bereich zwischen 180 und 190 μ A bzw. zwischen 210 und 220 μ A. Man findet also eine Häufung der Meßwerte im Bereich von 100 bzw. 200 μ A. Diesen Bereichen werden im allgemeinen unterschiedliche Ploidieklassen zugeordnet. In diesem Falle gehören also 18 Zellkerne der diploiden Kernklasse an, denen 2 tetraploide gegenüberstehen.

Eine solche Darstellung wird als Histogramm bezeichnet. Für alle untersuchten Fälle wurden solche Histogramme angefertigt; bei ihrem Vergleich ergaben sich folgende Befunde:

1. Die Emissionswerte in den einzelnen Ploidieklassen nehmen mit steigendem Individualalter ab. Diese Abnahme erfolgt, wie aus der Abb. 4 ersichtlich, etwa kontinuierlich. Die Streuung der Werte in den Ploidieklassen nimmt mit steigendem Alter zu.
2. Ferner ist der Abbildung zu entnehmen, daß mit steigendem Individualalter eine Zunahme von Zellkernen höherer Ploidieklassen erfolgt. Während bei dem Beispiel des 23jährigen Probanden 18 diploide und 2 tetraploide unter 20 Zellkernen waren, fanden sich beim 49jährigen bereits 4 tetraploide und 16 diploide; beim 65jährigen tritt dazu noch ein oktaploider Kern; beim 73jährigen finden sich schließlich 12 diploide, 4 tetraploide und 4 oktaploide Kerne.

III. Ergebnisse der einzelnen Präparate

Es wurde in jedem Präparat die Fluoreszenzemission bei 530 und 590 nm von 20 Zellkernen gemessen. Von diesen 2 x 20 Werten wurden mit Hilfe des programmierten Tischrechners Olivetti Programma 101 die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die einzelnen Präparate ermittelt. In der Tabelle I. sind die Ergebnisse aus allen Präparaten aufgeführt, die Präparate sind dabei nach steigendem Individualalter geordnet. Die Tabelle enthält: Eingangs-Nr., Angabe, zu welcher Färbereihe das Präparat gehörte, Datum der Entnahme, Anzahl der Stunden der Entnahme nach dem Tode, histologische Diagnose sowie Mittelwerte und Standardabweichungen für beide Wellenlängen.

Tabelle I.: Die Tabelle enthält die Eingangs-Nr. des Falles, Bezeichnung der Färbereihe, Datum der Entnahme, Lebensalter in Jahren, Zeitpunkt der Materialentnahme nach dem Tode in Stunden und Minuten, die histologische Diagnose sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte bei 530 und 590 nm.

Erläuterung der Abkürzungen:

abgel.	abgelaufene
Datum d. E.	Datum der Entnahme
deutl.	deutliche
Färber.	Färbereihe
fleckf.	fleckförmige
ger.	geringe
H., Hep., Hepat.	Hepatitis
hochgrad.	hochgradige
L., Lipo., Lipof.	Lipofuscinose
läpp.zent.	läppchenzentrale
m.	mit
mäß.	mäßige
Mes.	Mesenchym
mittl.	mittlere
o.p.B.	ohne pathologischen Befund
Pp. Fibr.	Periportalfibrose
reak., reakt.	reaktive
Reakt.	Reaktion
St. Abw.	Standardabweichung
teilw.	teilweiser
U.	Umbau
unsp.	unspezifische
Verf.	Verfettung
$\bar{x}$	Mittelwert
Zeitp. p. m.	Zeitpunkt der Entnahme nach dem Tode
Zust. n.	Zustand nach

Eing.-Nr.	Färber.	Datum d. E.	Alter	Zeitp. p. m.	Histol. Diagnose	535 nm		590 nm	
						$\bar{x}$	St. Abw.	$\bar{x}$	St. Abw.
895	B	17.09.69	12	4.00	Narbenleber	93,25	9,72	38,20	8,37
994	D	16.10.69	17	1.30	o.p.B.	97,05	8,32	26,25	6,19
1010	E	21.10.69	19	1.40	o.p.B.	106,25	7,87	49,70	8,53
900	B	19.09.69	23	2.30	o.p.B.	102,40	10,54	35,35	6,56
842	A	04.09.69	24	8.40	o.p.B.	101,00	14,77	49,35	14,76
1040	E	27.10.69	25	3.00	geringe Verfettung	100,85	7,07	33,75	5,92
1074	F	06.11.69	28	6.00	Narbenleber	74,60	7,03	24,90	7,82
947	C	03.10.69	29	1.00	abgel.H., teilw. Umbau	82,40	12,61	27,55	8,58
865	A	10.09.69	38	6.30	ger.unsp.reckt.Hep.	96,75	14,38	30,05	8,35
1115	G	14.11.69	39	7.00	o.p.B.	77,80	7,11	26,65	8,21
959	C	06.10.69	40	6.30	maß.fleckf.Verf.;lipof.	62,30	10,16	23,40	6,29
1049	E	29.10.69	49	1.00	fleck.Verf.lipofuszin.	67,40	7,40	27,65	6,64
891	B	16.09.69	49	1.40	o.p.B.	80,95	11,41	22,30	6,41
899	B	18.09.69	49	3.30	deutl.Verf.m.Mes.Reckt.	90,45	19,22	28,95	8,56
1051	E	30.10.69	49	5.00	o.p.B.	73,50	6,68	21,25	5,87

942	C	01.10.69	67	2.50	Narbenleber n. Hepat.	37,65	7,45	12,90	4,82
893	B	17.09.69	67	4.00	o.p.B.	61,45	13,62	21,15	7,49
1121	G	16.11.69	68	8.30	o.p.B.	59,55	12,43	28,65	9,38
1069	F	05.11.69	69	6.30	mäß. Verfettg.	69,65	8,37	17,65	5,43
1110	G	13.11.69	69	8.00	o.p.B.	51,80	6,96	22,85	5,81
970	D	08.10.69	71	3.00	o.p.B.	44,70	8,40	17,30	6,72
1123	G	16.11.69	72	2.00	o.p.B.	43,30	6,80	19,15	5,25
894	B	17.09.69	73	3.30	o.p.B.	59,85	16,25	19,40	8,35
896	B	17.09.69	73	3.30	Zust.n. Hep.	66,95	11,64	16,75	5,12
1058	F	01.11.69	74	4.00	o.p.B.; Lipof.	51,50	6,68	19,30	6,22
1064	F	04.11.69	76	9.00	o.p.B. ger. Verf.	38,30	5,82	14,35	3,74
980	D	11.10.69	77	2.30	lepp.zent. Lipof.	36,05	8,12	11,45	4,76
1047	E	29.10.69	78	3.30	o.p.B.	40,10	9,44	18,45	3,56
989	D	15.10.69	80	5.30	ger. Verfettg.	38,10	4,42	10,90	3,46
1018	E	23.10.69	81	1.30	mittl. Verf. ger. RES Akt.	38,65	4,69	15,45	5,55
863	A	09.09.69	81	4.00	mittl. Verf. ger. reek. Hep.	56,56	7,66	13,62	3,75
870	A	12.09.69	83	7.00	o.p.B.	73,06	16,33	22,00	8,66

IV. Ergebnisse der einzelnen Färbereien bei 530 nm.

Die insgesamt 51 untersuchten Fälle waren auf sieben Färbereien mit unterschiedlicher Fallzahl aufgeteilt. Dies war bedingt durch den unterschiedlichen Materialanfall während der Entnahmeperioden. Die Färbereien wurden mit Buchstaben (A - G) bezeichnet. Im einzelnen enthielten: Reihe A 11 Fälle, B 9 Fälle, C 5 Fälle, D 6 Fälle, E 10 Fälle, F 6 Fälle, G 4 Fälle.

In den folgenden Abbildungen 5a - g sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzemission bei 530 nm in einem Koordinatensystem gegen das Alter getrennt für jede Färbegruppe linear aufgetragen. In das Koordinatensystem ist ebenfalls die aus den Mittelwerten errechnete Regressionsgerade eingetragen.

Aus den Abbildungen 5 a - g geht hervor, daß die Fluoreszenzemission mit steigendem Individualalter stark abnimmt. Darüberhinaus ist das Fluoreszenzmissionsniveau in den einzelnen Färbereien unterschiedlich hoch. So liegen die Werte der Altersgruppen um 70 Jahre in der Färberei B in der Höhe von 60 Einheiten ($0,02 \mu A$), während sie in der Färberei D zwischen 30 und 40 Einheiten liegen. Die Steilheit des Abfalls der Fluoreszenzemission mit steigendem Alter ist in den einzelnen Färbereien deutlich unterschiedlich. Das spiegelt sich in dem Regressionskoeffizienten wieder, der z.B. bei Färberei A $-0,64$ und bei Färberei E $-1,18$ beträgt. Ferner ist auffällig, daß in Färbereien mit hoher Fallzahl und guter Besetzung der einzelnen Altersgruppen der Vergleich der Fluoreszenzemissionen in den höheren Altersklassen auf eine asymptotische Annäherung an einen bestimmten Grenzwert der Fluoreszenzemission schließen läßt. Im einzelnen sind die Befunde den Abbildungen und den Legendenden zu entnehmen.

Abb. 5 a - g. Fluoreszenzemission (530 nm) in Abhängigkeit vom Lebensalter bei den Färbereihen A - G.
Abszisse: Lebensalter in Jahren. Ordinate: Fluoreszenzemission in $0,02 \mu\text{A}$ pro angegebener Einheit. Eingetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen, die Eingangs-Nr. und die aus den Mittelwerten errechnete Regressionsgerade.

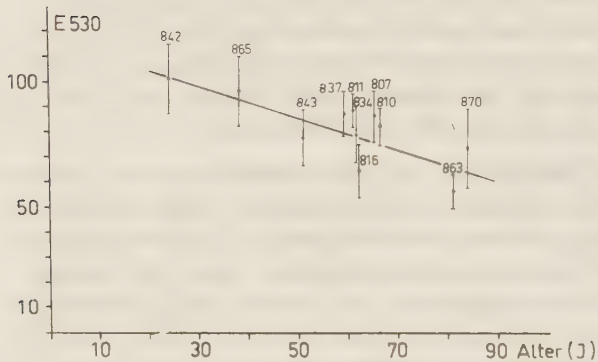


Abb. 5 a. Färbereihe A, 11 Fälle, die fast gleichmäßig über die verschiedenen Altersgruppen verteilt sind; um das 60. Lebensjahr liegt eine leichte Häufung vor. Die Regressionsgerade entspricht der Anordnung der Werte.

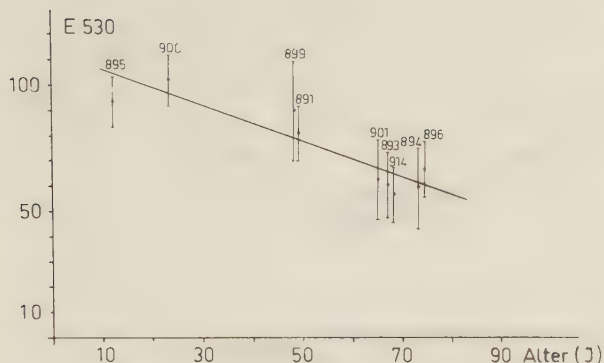


Abb. 5 b. Farberei B. 9 Fälle. In der Verteilung liegt eine Lücke bei 25 bis 50 Jahren und eine Häufung bei 70 Jahren vor. Auffällig ist, daß hier Nr.895 (12 J.) deutlich unterhalb der Regressionsgeraden liegt. Abgesehen von diesem Wert deutet sich bei den Werten der höheren Altersgruppen eine asymptotische Annäherung an eine Parallele zur Altersachse an.

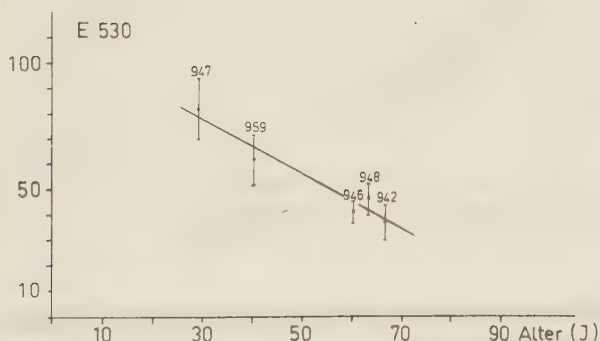


Abb. 5 c. Farberei C. 5 Fälle. Bei 60 Jahren 3 Fälle, je einer bei 29 und 40 Jahren. Die Standardabweichungen sind relativ gering, die Regressionsgerade entspricht den Werten gut.

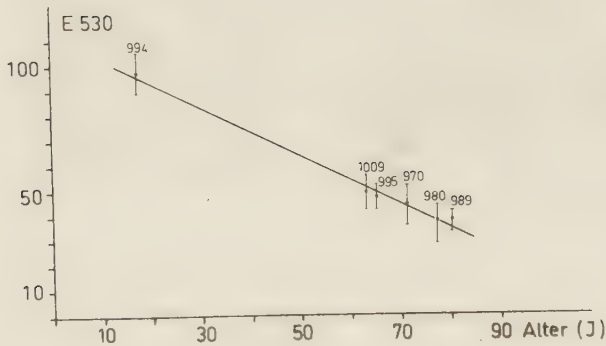


Abb. 5 d. Färbereihe D. 6 Fälle. Die Abbildung zeigt einen einzelnen Wert bei 17 Jahren und eine Häufung von 5 Werten zwischen 60 und 80 Jahren. Die Regressionsgerade entspricht genau dem Verlauf der Werte.

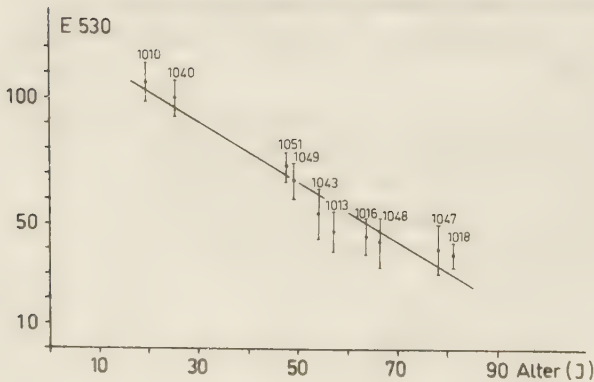


Abb. 5 e. Färbereihe E. 10 Fälle. Es liegt außer einer Lücke zwischen 25 und 40 Jahren eine homogene Verteilung vor. Bei dieser Färbereihe zeigen die Werte am deutlichsten von allen Abbildungen die asymptotische Annäherung an eine Parallele zur Altersachse.

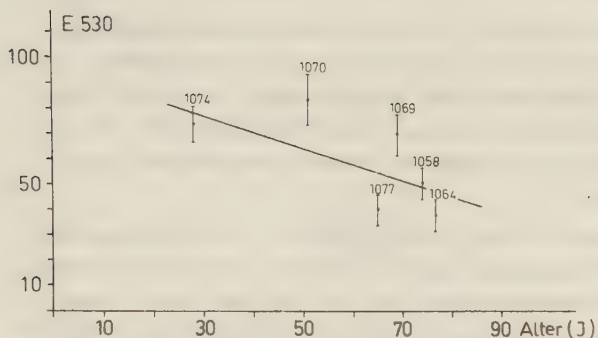


Abb. 5 f. Färbereihe F. 6 Fälle. Die Fälle dieser Serie zeigen eine erhebliche Streuung. Die Regressionsgerade hat jedoch eindeutig eine negative Steigung.

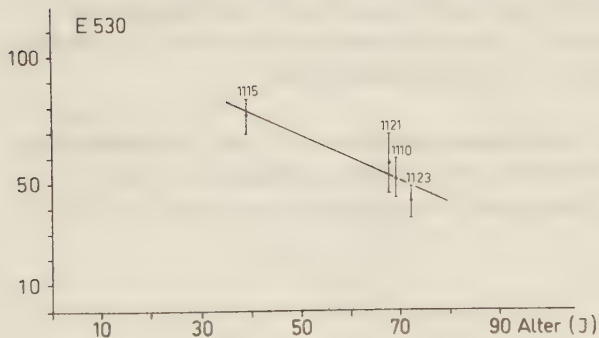


Abb. 5 g. Färbereihe G. 4 Fälle. Die Werte zeigen eine geringe Standardabweichung und entsprechen der Regressionsgeraden gut.

V. Ergebnisse der einzelnen Färbereihen bei 590 nm.

In den Abbildungen 6 a - g sind die aus den Meßwerten bei 590 nm errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen gegen das Alter aufgetragen. Auch hier sind die einzelnen Färbereihen getrennt dargestellt; die aus den Mittelwerten errechneten Regressionsgeraden sind eingezeichnet.

Die Abbildungen zeigen, daß bei 590 nm die Fluoreszenzemission mit steigendem Alter abnimmt, die Werte liegen jedoch erheblich niedriger als bei 530 nm; sie liegen bei den niedrigen Altersstufen bei 50 Einheiten ($1 E = 0,02 \mu A$), bei den hohen Altersklassen findet man dagegen Werte, die bis 10 Einheiten abfallen. Daraus ergibt sich, daß der Abfall der Regressionsgeraden flacher ist als bei den Messungen bei 530 nm. Dieser Befund wird statistisch erkennbar in der Größe der negativen Regressionskoeffizienten, die zwischen $-0,12$ bis $-0,49$ variieren, während bei den Messungen bei 530 nm diese Größen zwischen $-0,64$ und $-1,18$ liegen. Wie bei den Messungen bei 530 nm deuten auch hier die Ergebnisse der Färbereihen A, B und E eine asymptotische Annäherung an eine Parallele zur Altersachse an.

Abb. 6 a - g. Fluoreszenzemission (590 nm) in Abhängigkeit vom Lebensalter bei den Färbegruppen A - G.

Abszisse, Ordinate und Eintragungen wie Abb. 5 a - g.

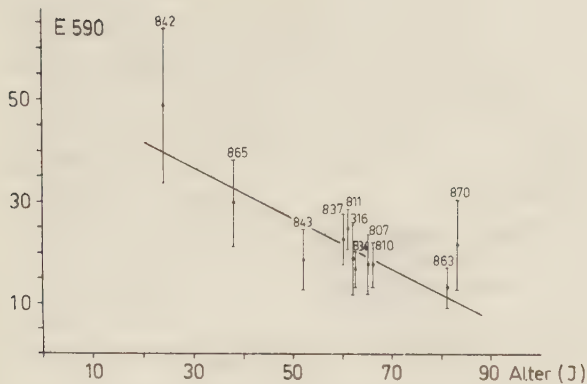


Abb. 6 a. Farbserie A. 11 Fälle. Die Abbildung zeigt eine besonders große Standardabweichung bei Nr.842, 865 und 870 (vgl. Abb. 5 a.) und eine asymptotische Annäherung der Werte an eine Parallele zur Altersachse, die der Regressionsgeraden nicht voll entspricht.

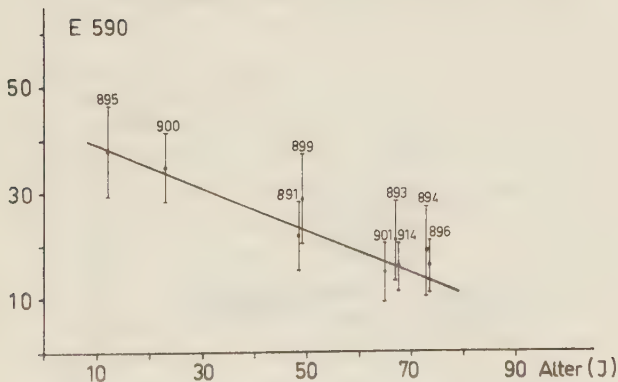


Abb. 6 b. Farbserie B. 9 Fälle. Die Abbildung zeigt eine gute Korrelation zwischen den Mittelwerten und der Regressionsgeraden; der Einzelwert Nr.895 fällt hier nicht unterhalb der Regressionsgeraden wie bei Abb.5 b (530 nm).

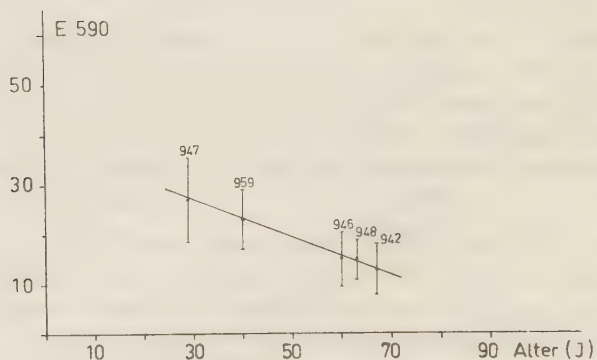


Abb. 6 c. Färbereihe C. 5 Fälle. Die Regressionsgerade entspricht den Werten gut.

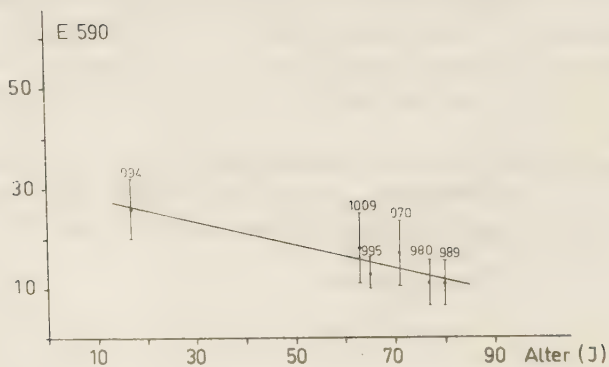


Abb. 6 d. Färbereihe D. 6 Fälle. Relativ flacher Verlauf der Regressionsgeraden, der jedoch den einzelnen Mittelwerten gut entspricht.

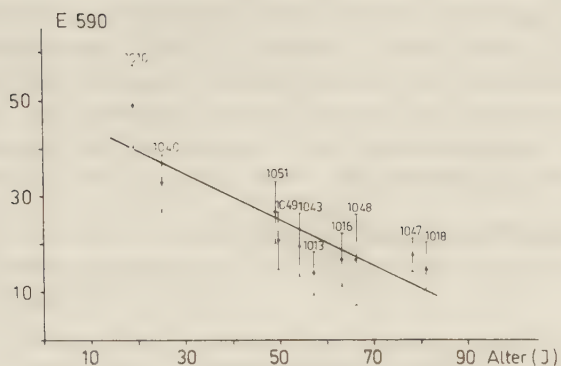


Abb. 6 e. Farbereihe E. 10 Fälle. Es fällt auf, daß die Regressionsgerade der Verteilung der Mittelwerte nicht voll entspricht; sie verläuft hier im Vergleich zu den anderen Farbereien sehr steil, wobei in ihrem unteren Teil ein flacherer Verlauf angebracht wäre.

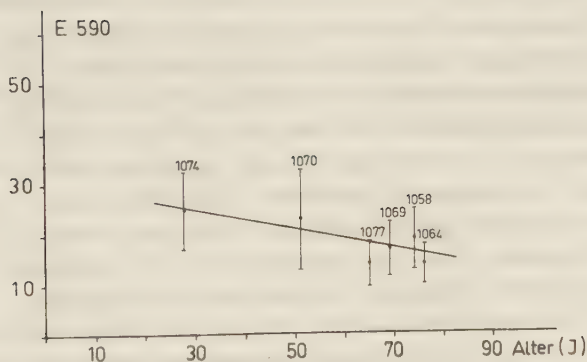


Abb. 6 f. Farbereihe F. 6 Fälle. Die Regressionsgerade verläuft sehr flach.

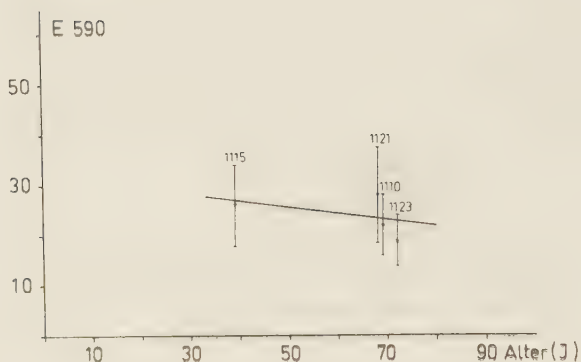


Abb. 6 g. Färbereihe G. 4 Fälle. Sehr flacher Kurvenverlauf; wegen der hohen Standardabweichungen bei zwei Fällen und der geringen Fallzahl ist hier ein altersabhängiger Abfall nicht sicher nachzuweisen.

VI. Abhängigkeit der Meßwerte bei 530 und 590 nm voneinander.

Während die Fluoreszenzemission bei 530 nm die Anzahl der freien DNS-PO_4^- -Gruppen in dem Anteil des Chromatins, in dem das DNS-Doppelmolekül wenig "verknäuel" ist, angibt, gilt die Fluoreszenzemission bei 590 nm als ein Maß für den Chromatin-Anteil, in dem das helical geordnete Doppelmolekül stärker "verknäuel" angeordnet ist. Diese Anteile könnten kernmorphologisch dem Eu- bzw. dem Heterochromatin entsprechen. Wie die Abbildungen 7 a - g zeigen, besteht eine lineare Beziehung zwischen den Fluoreszenzemissionen bei 530 und 590 nm. Die beiden, bei jedem Zellkern gemessenen Werte sind für jede Färbereihe gegeneinander aufgetragen, d.h. in Korrelation zueinander gesetzt.

Um die Altersabhängigkeit dieser Korrelation zu prüfen, wurden die Fälle der einzelnen Färbereihen nach Altersgruppen aufgeteilt. Gruppe I: 20-40 Jahre; Gruppe II: 40 bis 60 Jahre; Gruppe III: 60 bis 80 Jahre. Bei dieser Art der Darstellung zeigt sich, daß, entsprechend der Linearität der Korrelation, eine deutliche, altersabhängige Gruppierung der Einzelmeßwerte besteht.

Daraus ergibt sich folgende Beziehung zwischen der Fluoreszenzemission bei 530 und 590 nm sowie dem Individualalter:

1. Kerne, die eine niedrige Fluoreszenzemission bei 530 nm haben, zeigen auch bei 590 nm eine nur geringe Emissionsintensität.
2. Bei jungen Individuen sind hohe Fluoreszenzemissionswerte sowohl bei 530 nm wie auch bei 590 nm nachweisbar.

Abb. 7 a - g. Abhängigkeit der Meßwerte bei 590 nm von denen bei 530 nm in den Färbereihen A - G.

Abszisse: Fluoreszenzemission bei 530 nm in 0,02 μ A pro Einheit.

Ordinate: Fluoreszenzemission bei 590 nm in 0,02 μ A pro Einheit.

Eingetragen sind die Einzelmeßwerte, in drei Altersklassen geordnet (20-40, 40-60, 60-80 Lebensjahre). Die Geraden sind aus den Mittelwerten der Einzelfälle errechnet.

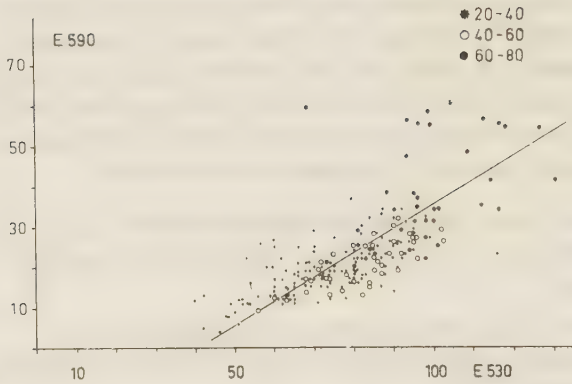


Abb. 7 a. Färberei A. Die Werte der hohen und mittleren Altersgruppe liegen in einem engen Bereich. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Meßgrößen.

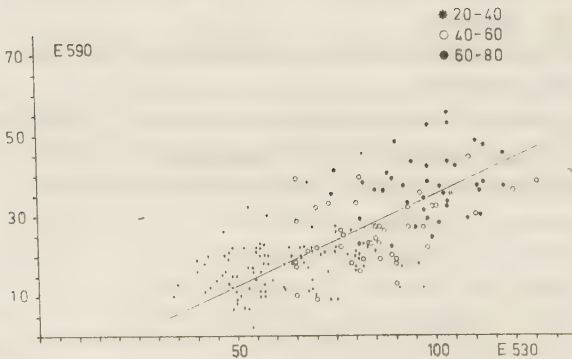


Abb. 7 b. Färberei B. Deutlicher linearer Zusammenhang zwischen den beiden Meßgrößen.

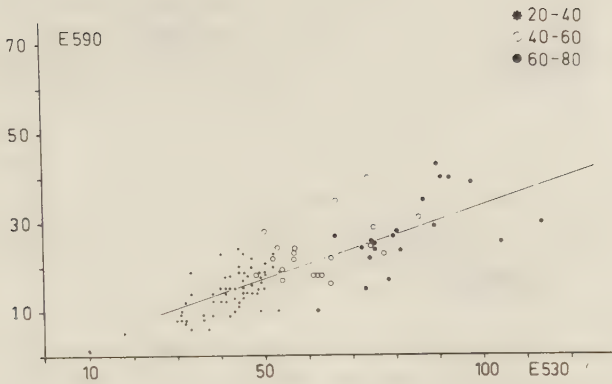


Abb. 7 c. Färberei C. Deutliche Gruppierung der einzelnen Punkte in die Altersklassen.

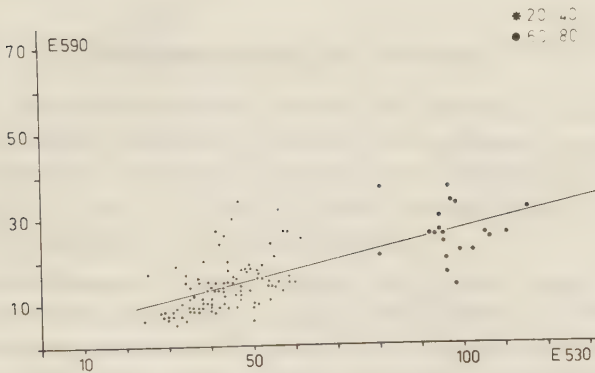


Abb. 7 d. Färberei D. Es fehlt die Altersgruppe 20 - 40 Jahre; die eingetragenen Werte zeigen eine ausgeprägte Gruppierung.

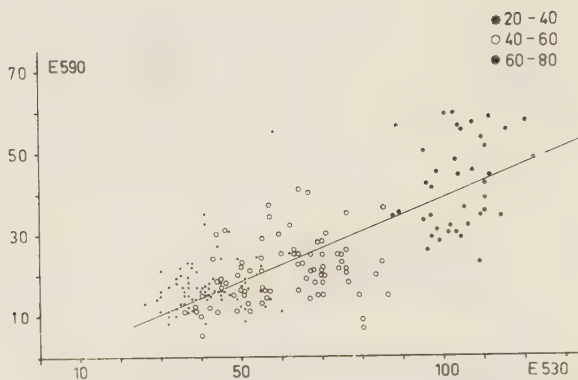


Abb. 7 e. Färberei E. Alle Altersgruppen sind gleichmäßig vertreten und deutlich gruppiert. Ein linearer Zusammenhang ist erkennbar.

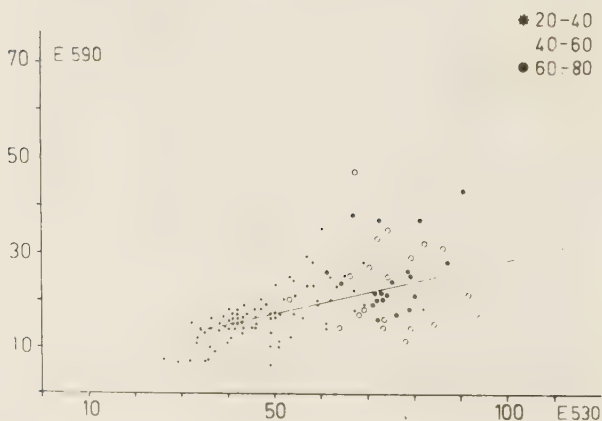


Abb. 7 f. Färberei F. Die einzelnen Altersklassen sind weniger deutlich gruppiert angeordnet. Die Werte der mittleren Altersgruppe liegen fast gleich

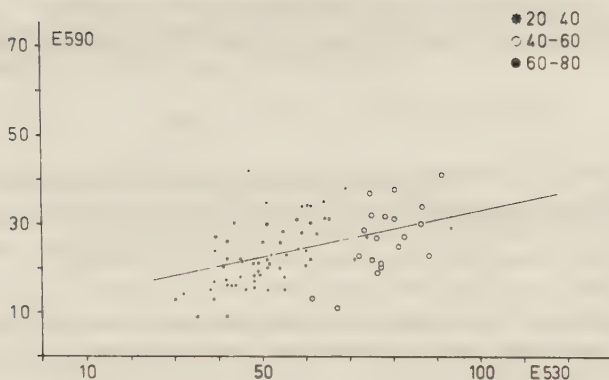


Abb. 7 g. Färbereihe G. Wegen der geringen Fallzahl nur wenige Punkte in der Abbildung, die Punkte der beiden vertretenen Altersgruppen liegen voneinander getrennt.

VII. Zusammenfassung mehrerer Meßreihen

Zur zusammenfassenden Darstellung eignen sich aus statistischen Gründen nur Reihen mit annähernd gleicher Besetzung. Dazu wurden aus den sieben Färbeserien drei ausgewählt, die 9, 10 und 11 Fälle umfassen, somit also 30 von insgesamt 51 Fällen vertreten.

Zur Prüfung, ob eine lineare, halb- oder doppelt-logarithmische Darstellung der Verteilung der Meßwerte am besten entspricht, wurden die Mittelwerte der Fälle logarithmiert und Regressionsberechnungen für die vier Möglichkeiten: Alter-Meßwert linear, nur Alter logarithmisch, nur Meßwert logarithmisch, beide Werte logarithmisch, durchgeführt.

Die Korrelationskoeffizienten für diese vier Möglichkeiten sind aus Tabelle II zu entnehmen. Wegen der relativ hohen Streuung der Mittelwerte weisen die Korrelationskoeffizienten nur geringe Unterschiede auf.

Färbereihe	A			B			E		
Abzisse Ordinate	x = Alter y = 530	x = Alter y = 590	x = 530 y = 590	x = Alter y = 530	x = Alter y = 590	x = 530 y = 590	x = Alter y = 530	x = Alter y = 590	x = 530 y = 590
x - linear y - linear	-0,824	-0,788	-0,808	-0,900	-0,945	-0,908	-0,963	-0,865	-0,913
x - logar y - linear	-0,8043	-0,904	-0,7545	-0,8150	-0,9237	-0,8839	-0,9702	-0,9261	-0,8787
x - linear y - logar	-0,7779	-0,8252	-0,8738	-0,8728	-0,9116	-0,9084	-0,9678	-0,8697	-0,9296
x - logar y - logar	-0,7353	-0,8782	-0,8307	-0,7821	-0,8756	-0,8983	-0,9445	-0,9050	-0,9134

Tabelle II.: Korrelationskoeffizienten.

Obwohl die Korrelation in einzelnen Färbereien bei linearer Darstellung oder bei logarithmischem Auftragen des Alters besser wäre, erschien es doch aus Plausibilitätsgründen besser, zur zusammenfassenden Darstellung das Alter linear und die Meßwerte logarithmisch aufzutragen. So wird eine asymptotische Annäherung der Regressionskurve an eine Parallele zur Altersachse erreicht; ein solcher Verlauf entspricht wohl den biologischen Gegebenheiten eher als eine Gerade, die die Altersachse schneidet.

Die Regressionsgleichung lautet dann:

$$\log E = b_0 - b_1 \times \text{Alter}.$$

b_1 ist der Regressionskoeffizient. Das zahlenmäßige Ergebnis bei Gruppe A lautet z.B.:

$$\log E = 2,10 - 0,0035 \times \text{Alter}.$$

Der Regressionskoeffizient von 0,0035 ist statistisch gesichert mit einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von P 1%.

Die weiteren Regressionsgleichungen und die graphische Darstellung sind in der Abbildung 8 angegeben.

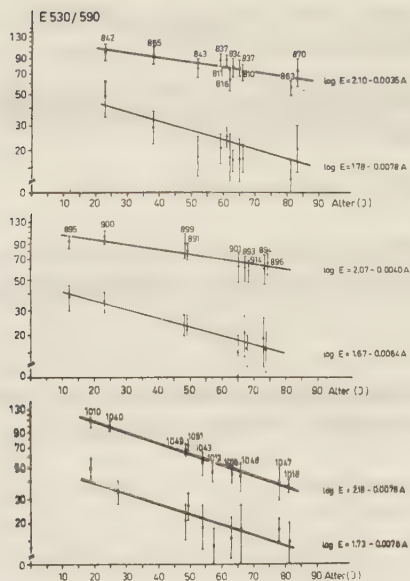


Abb. 8 Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus den drei Färbereihen A (oben), B (Mitte), E (unten). Die obere Gerade jedes Koordinatensystems gibt die Meßwerte bei 530 nm, Mittelwerte, Standardabweichungen und Eingangs-Nr., die untere die entsprechenden Werte bei 590 nm.

Abszisse: Alter, linear, in Lebensjahren.

Ordinate: Meßwerte in $0,02 \mu\text{A}$ pro angegebener Einheit, logarithmisch.

Rechts neben den Geraden sind die Regressionsgleichungen eingetragen.

In allen Meßserien erhielten wir einen statistisch gesicherten negativen Regressionskoeffizienten. Damit kann das Ergebnis einer Abnahme der Fluoreszenz-emission von acridingefärbten Leberzellkernen bei Messung bei 530 sowie 590 nm mit steigendem Individual-alter als gesichert gelten. Unterschiede in dem zahlen-mäßigen Wert des negativen Regressionskoeffizienten von Serie zu Serie können meßtechnisch oder auch durch Heterogenität des untersuchten Materials bedingt sein.

DISKUSSION

Unsere Befunde sprechen dafür, daß die Fluoreszenz-emission subvitaler menschlicher Leberzellkerne, die mit Acridinorange bei pH 4,1 nach vorheriger Acetylierung gefärbt und bei 530 nm gemessen worden sind, mit zunehmendem Individualalter kontinuierlich abnimmt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität erfolgt stetig und scheint am ehesten einer negativen Exponentialfunktion zu entsprechen. Auffällig ist, daß die wenigen Werte sehr junger Individuen (12 und 17 Jahre) deutlich niedriger liegen als die junger Erwachsener.

Bei 590 nm zeigen die gleichen Kerne ebenfalls eine statistisch signifikante Abnahme ihrer Emissionsintensität. In einzelnen Färbereihen scheint auch hier ein negativ exponentieller Zusammenhang zwischen Fluoreszenz-emission und Alter vorzuliegen.

Bei der Acridinorange-Färbung wird das kationische Farbstoffmolekül an im Zellkern frei vorhandene Anionen gebunden. Dazu gehören die Carboxylgruppen der Nucleoproteine, eine Reihe von Phosphatiden, Polysulfaten, Glycoproteinen, Polysacchariden und anorganischen Anionen, sowie die sterisch "freien" Nucleinsäure- PO_4^- -Gruppen des Nucleoproteinkomplexes. Eine spezifische Bindung des Acridinorangemoleküls an die freien DNS- bzw. RNS- PO_4^- -Gruppen kann nur erreicht werden, wenn man die Dissoziation aller anderen Anionen zurückdrängt. Durch eine Einstellung des pH auf 4,1 wird die Mehrzahl der organischen und anorganischen Anionen des Zellkerns in die nicht dissoziierte Form übergeführt, ohne daß die Tertiärstruktur der Kernproteine so erheblich verändert würde, daß die Aussagefähigkeit der Methode dadurch wesentlich beeinträchtigt wird (RIGLER, 1966).

Um eine Reaktion anderer kationischer Gruppen, z.B. der NH_4^+ -Gruppen mit den DNS- bzw. RNS-PO_4^- -Gruppen zu verhindern, müssen diese durch Acetylierung vom Reaktionsprozeß ausgeschaltet werden (DEITCH, 1964; RIGLER, 1966; KIEFER und Mitarb., 1968). Unter diesen Voraussetzungen kann bei den beschriebenen Färbbedingungen nach allen bis jetzt vorliegenden experimentellen Ergebnissen eine spezifische Bindung des Acridinorange-Kations an "freie" Nucleinsäure- PO_4^- -Gruppen angenommen werden (SCHUEMMELFEDER, 1948; SCHUEMMELFEDER und Mitarb., 1957 und 1958; von BERTALANFFY, 1963; LERMAN, 1961 u. 1963; RIGLER, 1966; KASTEN, 1967; SAKIEWICZ u. BAUSDORF, 1969). Die beiden Nucleinsäuren selbst unterscheiden sich eindeutig durch ihre typischen Fluoreszenzemissionsspektren. Das Maximum dieser Spektren liegt bei 530 nm für DNS und bei 665 nm für RNS. Die Ursache dafür ist in der unterschiedlichen Struktur der DNS- und RNS-Moleküle zu suchen. In die DNS-Doppelhelix lagert sich das Acridinorange-Kation so ein, daß seine Ebene senkrecht zur Längsachse des DNS-Moleküls steht (LERMAN, 1961 und 1963; RIGLER, 1966; KASTEN, 1967). Eine gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Acridinorange-Moleküle ist bei dieser Anordnung nicht möglich, da die Farbstoffmoleküle ausreichenden Abstand voneinander haben. Jedes Molekül emittiert die gesamte aufgenommene Energie als sichtbare Lichtstrahlung mit einem Maximum bei 530 nm (grün). Bei den an RNS-Moleküle angelagerten Acridinorange-Molekülen tritt dagegen folgendes Phänomen auf: Die RNS ist ein fadenförmiges Kettenmolekül, in dem die Acridinorange-Moleküle palisadenartig nebeneinander angeordnet eingelagert werden. Dadurch wird die Distanz der Acridinorange-Moleküle so gering, daß im Anregungszustand zwischen ihnen Resonanzen auftreten können.

Bei entgegengesetztem Spin der angeregten Elektronen zweier benachbarter Moleküle hebt sich deren Energie nach außen hin auf und geht für die Abstrahlung verloren. Es kommt durch Summation dieser Verluste zu einer Emission von deutlich energieärmeren, d.h. langwelligerem Licht (ZANKER, 1952).

Aufgrund dieser Gegebenheiten ist eine weitere Unterscheidung im DNS-Nucleoproteinkomplex (DNP) möglich. Rein helikal angeordnetes DNP strahlt die aufgenommene Energie, die durch UV-Licht zugeführt wurde, bei 530 nm ab. Liegen im DNP jedoch Anteile vor, in denen das helikal geordnete DNS-Molekül stark "verknäuelte" ist, so tritt auch hier durch Summation von Energieverlusten durch Resonanzphänomene zwischen benachbarten Acridinorangemolekülen eine Verschiebung zu energieärmerem Emissionslicht auf. RIGLER (1966) gibt als Emissionsmaximum für diese stärker verknäuelte DNS die Wellenlänge 590 nm an.

Diese physiko-chemischen Verhältnisse gestatten es also, am gleichen Zellkern die sterisch "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen spezifisch und quantitativ zu erfassen, wobei eine Trennung in stärker und weniger stark verknäuelte DNS möglich ist. Aufgrund dieser experimentell weitgehend gesicherten Gegebenheiten (ZANKER, 1952; BEERS und Mitarb., 1958; LERMAN, 1961 und 1963; LEITH, 1963; MAC INNES und Mitarb., 1966; NEVILLE und DAVIES, 1966; ICHIMURA und Mitarb., 1969; SUGAR, 1970) können die vorliegenden Ergebnisse in folgender Weise interpretiert werden:

Mit zunehmendem Individualalter nehmen bei menschlichem Leberparenchym die im Zellkern vorhandenen sterisch "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen ab, und zwar sowohl bei helikal geordneter als auch bei stärker "verknäuelter" DNS. Diese Abnahme erfolgt von einem Maximalwert, der beim

Menschen zwischen dem 18. und 30. Lebensjahr erreicht wird, kontinuierlich. Die Abnahmerate scheint jedoch in den verschiedenen Altersgruppen unterschiedlich groß zu sein. So findet man zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr eine stärkere Abnahmerate als bei Individuen zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Die Anzahl der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen scheint sich demnach asymptotisch einem bestimmten Grenzwert zu nähern. Auffällig ist, daß bei den jüngsten von uns untersuchten Individuen die Anzahl der freien DNS-PO_4^- -Gruppen deutlich unter den Maximalwerten liegt, die bei jungen Erwachsenen gefunden wurden. Allerdings ist die Fallzahl in dieser Altersgruppe so gering, daß abschließende Aussagen nicht gemacht werden können.

Die Abnahme der mit Acridinorange nachweisbaren "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen mit zunehmendem Individualalter spricht dafür, daß diese Gruppen mit zunehmendem Alter zunehmend blockiert werden. Nach den Untersuchungen von HUANG und BONNER (1962), FRENSTER und Mitarb. (1963), FRENSTER (1965 a,b,c) und HUANG (1969) sind die freien DNS-PO_4^- -Gruppen für die Regulation des genetischen Informationsflusses von Bedeutung, da sie basischen Kernproteinen, denen Repressorfunktionen zugeschrieben werden, als Haftpunkte dienen können. Der reprimierte Informationsgehalt kann von der DNS-abhängigen RNS-Polymerase nicht mehr abgelesen werden. In der alternden menschlichen Leberzelle scheint also eine zunehmende Reprimierung von genetischem Material vorzuliegen, die bis zu einem Grenzwert geht.

Dabei muß jedoch betont werden, daß mit der von uns angewandten Methode nur quantitative Aussagen über momentane Funktionsstrukturen möglich sind, deren Zusammenhang mit vitalen Funktionsabläufen noch weitgehend ungeklärt ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Färbung mit Acridinorange nach vorheriger Acetylierung können die in den DNS- bzw. RNS-Molekülen vorhandenen sterisch "freien" PO_4^- -Gruppen quantitativ und selektiv cytofluorometrisch bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus postmortal entnommenen menschlichen Leberpunktionszylindern Ausstrichpräparate angefertigt und in sieben Färbereihen mit insgesamt 51 Fällen verschiedener Altersgruppen mit Acridinorange nach Acetylierung bei pH 4,1 gefärbt, und die Fluoreszenzemission von jeweils 20 Zellkernen pro Präparat bei 530 und 590 nm gemessen.

Es ergab sich eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzemission mit zunehmendem Individualalter bei beiden Wellenlängen; dieser Befund entspricht einer Abnahme der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen der helical geordneten und der stärker verknäuelten DNS.

Die altersabhängige Abnahme wurde in allen Färbereihen statistisch gesichert; drei Färbereihen zeigten einen Verlauf, der am ehesten durch eine negative Exponentialfunktion beschrieben werden kann.

Die Abnahme der mit Acridinorange darstellbaren PO_4^- -Gruppen spricht für eine zunehmende Blockierung dieser Gruppen mit steigendem Individualalter. Da nach den in der Literatur beschriebenen Befunden die Anlagerung von Repressorsubstanzen an diese Gruppen wahrscheinlich ist, sprechen unsere Befunde für eine zunehmende Reprimierung genetischer Information mit dem Alter.

LITERATUR

1. BEERS, R.F., D.D. HENDLEY und R.F. STEINER: Inhibition and activation of polynucleotide phosphorylase through the formation of complexes between acridine orange and polynucleotides. Nature (Lond.) 182, 242-244 (1958)
2. v.BERTALANFFY, L.: Acridinorange fluorescence in cell physiology, cytochemistry and medicine. Protoplasma (Wien) 57, 51-83 (1963)
3. BÖHM, N. und E. SPRENGER: Fluorescence Cytophotometry: A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA. Histochemie 16, 100-118 (1968)
4. DEITCH, A.D.: A method for the cytophotometric estimation of nucleic acids using methylene blue. J. Histochem. Cytochem. 12, 451-461 (1964)
5. DENKHAUS, W.: Kerngröße, DNS-Gehalt und Ploidieklassen menschlicher Leberzellen in Abhängigkeit vom Lebensalter. Z.Geront. 3, 88-96 (1970)
6. DENKHAUS, W. und D. HEIMER: Mikrofluorometrische Bestimmungen der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen im Chromatin nativer Leberzellkerne von jungen und alten Meerschweinchen. Gerontologia (Basel) 16, 1-13 (1970)
7. ENESCO, H.E.: A cytophotometric analysis of DNA content of rat nuclei in ageing. J. Geront. 22, 445-448 (1967)

8. FRENSTER, J.H.: A model of specific derepression within interphase chromatine.
Nature (Lond.) 206, 1269 (1965a)
9. FRENSTER, J.H.: Mechanisms of repression and derepression within interphase chromatine.
In: DANE. The chromosome:
Structural and functional aspects.
pp. 78-101 (Williams u. Wilkins, Baltimore 1965 b)
10. FRENSTER, J.H.: Nuclear polyanions as de-repressors of synthesis of ribonucleic acid.
Nature (Lond.) 206, 680-683 (1965 c)
11. FRENSTER, J.H., V.G. ALLFREY und A.E. MIRSKY: Repressed and active chromatine isolated from interphase lymphocytes.
Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.) 50, 1026-1032 (1963)
12. GURDON, J.B. und V. UEHLINGER: "Fertile" intestine nuclei.
Nature (Lond.) 210, 1240 (1966)
13. HEINE, H.: Der Ultrapak.
Z.wiss.Mikr. 48, 450-465 (1931)
14. HERMANN, R.L., A.R. O'MEARA, A.P. RUSSELL und L.E.DOWLING: Age-associated changes in the nucleoprotein complex of mouse liver.
8th. Intern.Congr.Geront.Proc. Vol.I (Wash.) 141-142 (1969)

15. HUANG, R.CH.C.: Decoding of genetic information in higher systems.
8th.Intern.Congr. Geront.Proc.Vol. I
(Wash.) 131-133 (1969)
16. HUANG, R.CH.C. und J.BONNER: Histone, a suppressor of chromosomal RNA-synthesis.
Proc.Nat. Acad.Sci. (Wash.) 48, 1216-1222
(1962)
17. ICHIMURA, S., M. ZANCA, H. FUGITA und T. ITO: The nature of strong binding between acridine orange and deoxyribonucleic acid as revealed by equilibrium dialysis and thermal denaturation.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.)190, 116-125
(1969)
18. JACOB, F. und J. MONOD: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.
J.mol.Biol. 3, 318-356 (1961)
19. KASTEN, F.H.: Cytochemical studies with acridine and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids.
III. Acridine orange.
Int.Rev.Cytol. 21, 145-201 (1967)
20. KIEFER, G., R. KIEFER und W. SANDRITTER: Cytophotometric determination of the binding of basic dyes by DNA following acetylation.
Histochemie 14, 65-71 (1968)
21. LEITH, J.D.jr.: Acridine orange and acriflavine inhibit deoxyribonuclease action.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.)72, 643-644(1963)

22. LERMAN, L.S.: Structural considerations in the interaction of DNA and acridines.
J.Mol.Biol. 3, 18-30 (1961)
23. LERMAN, L.S.: The structure of the DNA-acridine complex.
Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.) Biochem. 49, 94-101 (1963)
24. MAC INNES, J.W. und R.B. URETZ: Spectral analysis of the binding of acridine orange to polytene chromosomes.
Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.) 55, 1109 (1966)
25. NEVILLE, D.M. und D.R. DAVIES: The interaction of acridine dyes with DNA. An x-ray diffraction and optical investigation.
J.mol.Biol.17, 57-61 (1966)
26. RIGLER, R., Jr.: Microfluorometric characterisation of intracellular nucleid acids and nucleoproteins by acridinorange.
Acta physiol.scand.67, Suppl.267: 1-123 (1966)
27. RIS, H.: Ultrastructure of the animal chromosome. In: Regulation of nucleic acid and protein synthesis.
Hrsg.: V.V.KONINGSBERGER und L.BOSCH, Amsterdam-London-New-York, 1967, 11-21
28. ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik
München, Wien 1968, 174
29. SAJKIEWICZ, K. und B. BAUSDORF: Zur pH-abhängigen differentiellen Acridin-orange-Fluorochromierung der Desoxribonucleoproteide von Herz- und Leberzellkernen.
Histochemie 18, 267-276 (1969)

30. SCHÜMMELFEDER, N.: Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit Acridinorange.
Naturwissenschaften 35, 346 (1948)
31. SCHÜMMELFEDER, N., K.J. EBSCHER und R.E. KROGH:
Die Grundlage der differentiellen Fluorochromierung von Ribo- und Desoxyribonucleinsäure mit Acridinorange.
Naturwissenschaften 44, 407-468 (1957)
32. SCHÜMMELFEDER, N., R.E. KROGH und K.J. EBSCHER:
Färbungsanalysen zur Acridinorange-Fluorochromierung.
Histochemie 1, 1-28 (1958)
33. SUGAR, J.: Ultrastructure of cells stained with acridine orange.
Virchows Arch.path.Anat.Abt. B Zellpath.5, 209-218 (1970)
34. TAUCHI, H. und T. SATO: Some micromeasuring studies of hepatic cells in senility.
J.Geront. 17, 254-259 (1962)
35. ZANKER, V.: Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate ("reversibler Polymerisate") der Acridinorange durch Absorption und Fluoreszenzmessungen in wässriger Lösung.
Z.phys.Chem. 199, 225-228 (1952)

Herrn Professor Dr. H. Bredt (Direktor des Pathologischen Institutes) möchte ich herzlich für die wertvollen Anregungen und die Möglichkeit danken, die Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Dr. W. Denkhaus danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei den Untersuchungen.

Bei Herrn Privatdozent Dr. L. Horbach (Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation; Direktor: Professor Dr. Dr. Koller) möchte ich mich für die Beratung und statistische Auswertung der Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Am 25. Mai 1944 wurde ich als Sohn des Bankkaufmanns, Karl Heimer und seiner Ehefrau Anne-Marie, geb. Frieß, in Groß-Umstadt, Hessen, geboren. Während der Kriegsgefangenschaft meines Vaters bis 1948 wuchs ich im Hause meiner Großeltern in meinem Geburtsort auf.

Von Ostern 1950 an besuchte ich die Volksschule in Groß-Umstadt und wechselte dann auf die dortige Max-Planck-Schule -Gymnasium- über. Das Abitur bestand ich im Frühjahr 1963 im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig dieser Schule.

Nach einer dreijährigen Militärdienstzeit begann ich im Sommersemester 1966 das Studium der Medizin an der Karl-Rupprecht-Universität in Heidelberg. Dort legte ich nach fünf Semestern im Sommer 1968 die Ärztliche Vorprüfung ab. Zum klinischen Studium wechselte ich im Wintersemester 1968/69 an die Universitätskliniken der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz über. Ich habe im Herbst 1971 das medizinische Staatsexamen abgelegt.

